

动 物 学 研 究 1998, 19 (6): 489～492 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

489-492 Q959.468 Q592

鲤鱼皮肤粘液与血清中免疫球蛋白的比较研究*

COMPARATIVE STUDIES ON THE IMMUNOGLOBULIN IN SKIN MUCUS AND SERUM OF CARP

关键词 鲤鱼，免疫球蛋白，皮肤粘液，血清
Key words Carp (*Cyprinus carpio* L.), Immunoglobulin, Skin mucus, Serum
中图分类号 Q959.468

鱼类是比较低等的脊椎动物，它的免疫机理远不如哺乳类和鸟类完善，其血清中存在的免疫球蛋白主要是 IgM。除此之外，在某些鱼类的皮肤粘液中也发现有大量的免疫球蛋白，它们在鱼类的免疫中起着相当重要的作用。人们已经从羊头鲷（*Archosargus probatoceph-alus*）、香鱼（*Plecoglossus altivelis*）、硬头鳟（*Salmo gairdneri*）及鲇鱼（*Parasilurus asotus*）等鱼类的皮肤粘液中发现了免疫球蛋白（Lobb 等，1981；Hayman 等，1993；St. Liuis-Cormier，1984；Diconza，1971）。在鲤鱼的皮肤粘液中也分离纯化出了免疫球蛋白，但其免疫原性及理化性质是否与血清中免疫球蛋白相同，尚有争议。本文以正常生活状态下的非免疫鲤鱼为材料，参照 Rombout 等人的方法，对皮肤粘液及血清中的免疫球蛋白进行了初步分离纯化，并对它们的理化性质和免疫原性进行了比较研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料 鲤鱼（*Cyprinus carpio* L.）60 尾，每尾约 0.5 kg，取自莱芜雪野水库。

1.2 鲤鱼免疫球蛋白的提取 皮肤粘液免疫球蛋白的提取：蒸馏水冲洗鲤鱼体表 3 次，用干净玻片刮取皮肤粘液（注意不要用力太重，以免皮肤出血），收集皮肤粘液 10 mL，加 0.6% 的生理盐水 10 mL，搅拌，使之充分混匀，9 000 r/min，4℃ 离心 30 min，取上清液，用 0.02 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液透析 24 h，中间换缓冲液 3 次，过葡聚糖凝胶（Sephadex G－200）层析柱（柱直径 2.5 cm，柱长 100 cm），流速为 20 mL/h，收集速度为每只试管/10 min，收集第 1 峰，即为鲤鱼皮肤粘液 IgM（Harrel，1976）。

血清免疫球蛋白的提取：将鲤鱼断尾取血，收集血液，置室温 1 h 后，于 4℃ 冰箱放置 3 h，待血清充分析出后，3 000 r/min 离心 15 min，收集上清液（约 50 mL 血清），45% 饱和硫酸铵沉淀，4℃ 冰箱过夜；次日，10 000 r/min，4℃ 离心 10 min，收集沉淀，用 25 mL 0.05 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液将沉淀溶解，用 0.02 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液透析 24 h，层析（条件同上），收集的主峰即为血清 IgM（Kobayashi 等，1985）。

1.3 高效液相色谱（HPLC）分析 在 Shimadzu LC－6A 高效液相色谱分析仪上进行，DIOL－150 柱（日本岛津），工作温度为 25℃，紫外检测波长为 280 nm，流动相为：10 mmol/L PBS（pH＝7.0）含 0.2 mol/L Na_2SO_4、0.01% 叠氮化钠，流速为 1 mL/min，进样量为 20 μL。

---

* 山东省自然科学基金资助项目（编号：Q94D 0222）
本文 1998－01－04 收到，1998－03－25 修回

1.4　免疫原性分析　抗血清的制备：在兔子的四足掌处的皮下各注射0.5 mL抗原－福氏完全佐剂乳化剂（抗原分别是鲤鱼血清免疫球蛋白和皮肤粘液免疫球蛋白，含量为0.5 mg/mL），每隔7 d注射1次，共注射5次；心脏穿刺取血；参照《实验免疫学》（北京医学院微生物学教研室，1980）方法收集抗血清。

双免疫扩散试验：按常规方法进行。

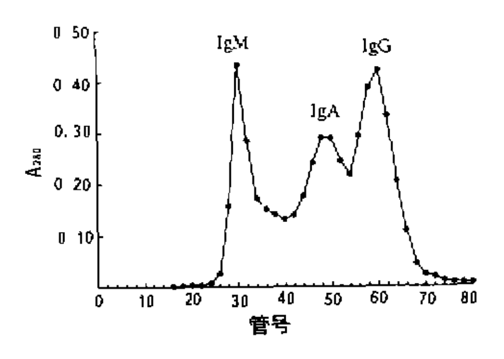


图1　人免疫球蛋白工作标准液（兰州产）的 Sephadex G－200层析图
Fig.1　The Sephadex G－200 gel filtration of human immunoglobulin standard
峰1（peak 1）：IgM（900 kD）；峰2（peak 2）：IgA（390 kD）；峰3（peak 3）：IgG（150 kD）。

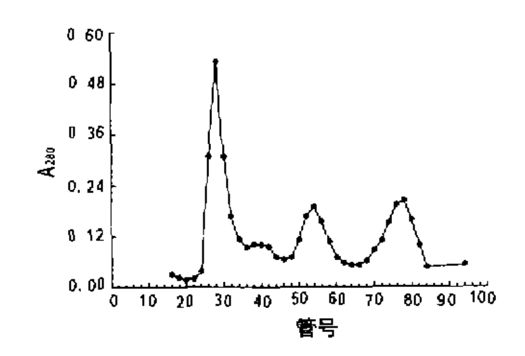


图2　鲤鱼皮肤粘液的 Sephadex G－200层析图
Fig.2　The Sephadex G－200 gel filtration of carp skin mucus
峰1：皮肤粘液 IgM（peak 1：carp skin mucus IgM）。

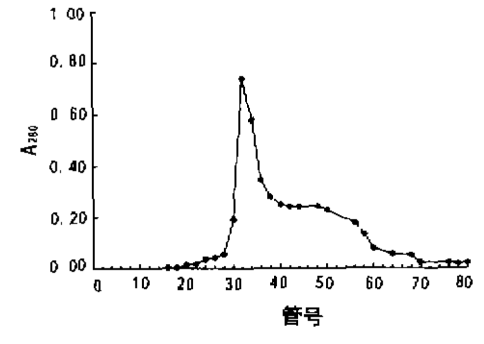


图3　鲤鱼血清的 Sephadex G－200层析图
Fig.3　The Sephadex G－200 gel filtration of carp serum



2　实验结果

2.1　鲤鱼皮肤粘液及血清的 Sephadex G－200柱层析特性的分析　鲤鱼皮肤粘液、血清及人的免疫球蛋白工作标准液（兰州产），在完全相同的条件下过 Sephadex G－200层析柱，鲤鱼血清经45%饱和硫酸铵沉淀后层析，只出现1个峰（图3），该峰的洗脱时间为310 min，同人的 IgM 峰（洗脱时间为290 min）相近（图1），此即为鲤鱼血清 IgM 峰。皮肤粘液经9 000 r/min低温离心后层析，出现了1个洗脱时间（第1峰洗脱时间为290 min）同鲤鱼血清和人的免疫球蛋白工作标准液第1峰位置相近的峰，即皮肤粘液 IgM 峰（图2）。

2.2　鲤鱼免疫球蛋白高效液相色谱（HPLC）分析　不解离的免疫球蛋白的高效液相色谱：将收集到的鲤鱼皮肤粘液和血清中的 IgM 峰及人的 IgM 以完全相同的条件进行高效液相层析，两组 IgM 都呈现单一对称峰，表明提取的免疫球蛋白是较纯的，各组免疫球蛋白在柱中的保留时间分别为皮肤粘液 IgM 4.975 min、血清 IgM 4.833 min、人 IgM 4.742 min。

解离后的各种免疫球蛋白高效液相色谱：图4为 Sephadex G－200提纯的鲤鱼两组免疫球蛋白经巯基乙醇处理后的高效液相色谱图。从图中我们可以看出，除在原有 IgM 峰的位置上继续留有一较小峰外，在其后每组免疫球蛋白都新出现两个明显的峰，显然是经巯基乙醇处理后，免疫球蛋白解离为重链和轻链，它们分别为重链峰和轻链峰。血清 IgM 重轻链峰的保留时间分别为9.742 min和10.462 min；

皮肤粘液 IgM 重轻链峰的保留时间分别为 9.950 min 和 10.592 min；人 IgM 经相同处理后的高效液相层析图同上述两组 IgM 相似，重链和轻链的保留时间分别为 9.150 min 和 10.592 min。

2.3 鲤鱼免疫球蛋白的免疫原性分析

免抗鲤鱼皮肤粘液 IgM 的抗血清不仅与鲤鱼皮肤粘液 IgM 有沉淀反应，而且与血清 IgM 也有沉淀反应，并且沉淀线之间互相融合，不出现交叉或部分交叉现象。抗鲤鱼血清 IgM 的抗血清不仅与鲤鱼血清 IgM 有沉淀反应，而且与鲤鱼皮肤粘液免疫球蛋白也有沉淀反应，并且沉淀线之间互相融合，同样不出现交叉或部分交叉现象（图 5）。

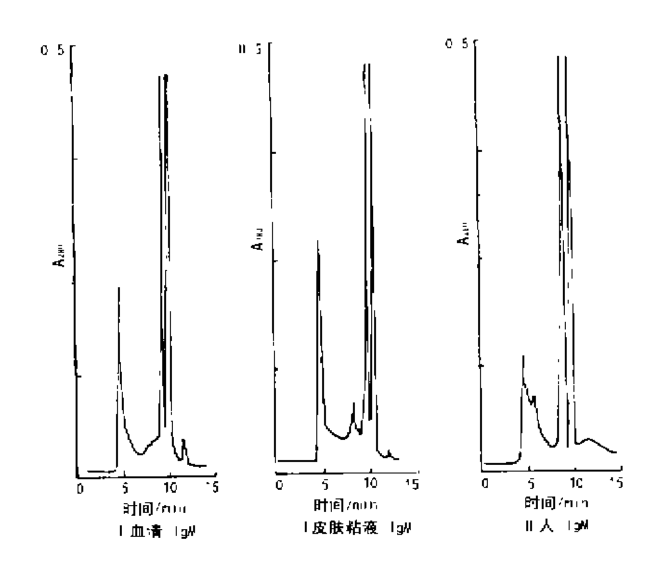


图 4 提取的鲤鱼血清、皮肤粘液免疫球蛋白及人 IgM 经巯基乙醇处理后的高效液相层析（HPLC）图（DIOL－150 柱）

Fig.4 The HPLC of immunoglobulin in carp serum, skin mucus and human IgM reduced by the mercaptoethanol (2－ME) (Column: DIOL－150)

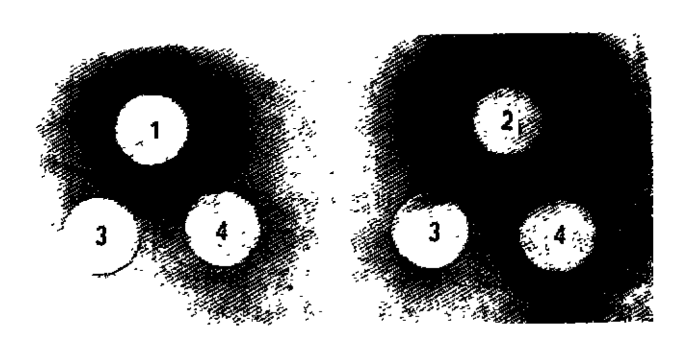


图 5 双向免疫扩散试验

Fig.5 Ouchterlony comparison of carp serum and skin mucus immunoglobulin

孔中分别是：①兔抗鲤鱼皮肤粘液 IgM 的抗血清（cell; ①rabbit anti-carp skin mucus IgM）；

②兔抗鲤鱼血清 IgM 的抗血清（rabbit anti-carp serum IgM）；

③血清 IgM（carp serum IgM）；

④皮肤粘液 IgM（carp skin mucus IgM）。

3 讨论

高压液相色谱分析表明，我们分离得到的免疫球蛋白纯度是较高的。从保留时间可以看出，鲤鱼的皮肤粘液 IgM 与血清 IgM 的分子量相近，略低于人的 IgM，解离后重轻链的分子量也基本一致，同人 IgM 解离后的重轻链相近；从双向免疫扩散结果来看，鲤鱼皮肤粘液免疫球蛋白的抗血清除与自身相对应的免疫球蛋白发生沉淀反应外，还可与血清免疫球蛋白发生沉淀反应。抗鲤鱼血清免疫球蛋白的抗血清除与血清免疫球蛋白发生沉淀反应外，也可同鲤鱼皮肤粘液免疫球蛋白发生免疫沉淀反应，都可形成沉淀线，并且沉淀线互相融合，不出现交叉或半交叉反应。这些结果表明鲤鱼的皮肤粘液中存在着与血清 IgM 在理化特性和免疫原性基本一致的免疫球蛋白。

不少人认为鱼类存在着粘液性免疫系统，支持这一观点的主要实验证据包括以下几个方面：①鱼类经特异性抗原浸泡免疫后，可在皮肤粘液检测到特异性抗体，而在血清中则很少或检测不到这些特异性抗体（Rombout, 1989; Fletcher, 1973; Lobb等, 1984）；②Lobb等（1981）在研究羊头鲷时发现，在羊头鲷的皮肤粘液中存在两种免疫球蛋白，一种为四聚体，与血清中免疫球蛋白相同，另一种为二聚体，分子量为 95 kD，他认为二聚体可能类似于哺乳类的分泌性免疫球蛋白 IgA；③Rombout等（1993）在研究鲤鱼皮肤粘液免疫球蛋白和血清免疫球蛋白关系时发现，以纯化的粘液免疫球蛋白制备的单克隆抗体只与粘液

免疫球蛋白反应，而不能与血清免疫球蛋白结合。

但是，我们认为已有的实验证据并不能证明在鱼类中存在着一个完全独立于血清免疫球蛋白的分泌性免疫系统。不同的免疫途径导致皮肤粘液和血清中免疫球蛋白水平的差异，是由于不同部位的淋巴细胞接触抗原程度不同造成的。Rombout 等（1993）用皮肤粘液制备的单克隆抗体只能与皮肤粘液中的免疫球蛋白结合，而不能与血清中的免疫球蛋白结合，但是以血清免疫球蛋白制备的单克隆抗体却能与皮肤粘液免疫球蛋白结合，说明在皮肤粘液中存在着大量的免疫原性与血清一致的免疫球蛋白。此外更多的研究证明皮肤粘液免疫球蛋白和血清免疫球蛋白在许多方面是相同的，我们的结果也与不少研究者的结果一致，St. Louis-Cormier（1984）和 Itami（1988）发现硬头鳟和香鱼的皮肤粘液免疫球蛋白与各自血清中的免疫球蛋白理化性质一致；Rombout 等（1993）在对鲤鱼的皮肤粘液进行研究时发现皮肤粘液免疫球蛋白与血清免疫球蛋白电泳结果也相同；Lobb 等（1981）证明羊头鲷皮肤粘液免疫球蛋白具有同血清免疫球蛋白相同的免疫原性；Lobb（1987）在研究鲇鱼皮肤粘液和血清免疫球蛋白时发现二者的分子量及各自的重轻链完全一致，并且免疫原性也一致。鱼类的免疫系统在不同种类中存在着相当大的差异，在部分鱼类中也可能存在类似高等动物的免疫球蛋白的分泌机制，但是，认为鱼类存在着一个独立于血清免疫球蛋白的分泌性免疫系统，证据明显不足。通过以上分析及我们在鲤鱼中所得到的实验结果说明：皮肤粘液中的免疫球蛋白与血清免疫球蛋白可能是同源的。

杨桂文 安利国 王长法 温武军

YANG Gui-wen AN Li-guo WANG Chang-fa WEN Wu-jun

（山东师范大学生物系 济南 250014）

(*Department of Biology of Shandong Normal University, Jinan* 250014)